

УДК 576.895.122

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ НЕОДНОРОДНОСТЬ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ
ПАРТЕНИТ MICRORHALLUS PIRIFORMES И M. PYGMAEUS
(TREMATODA: MICRORHALLIDAE)**

© К. В. Халтурин, Н. А. Михайлова, А. И. Гранович

Методом полимеразной цепной реакции со случайными праймерами (RAPD) была изучена генетическая структура нескольких природных популяций трематод сем. Microphallidae, паразитирующих в литоральных моллюсках *Littorina saxatilis* и *L. obtusata* Белого моря. Первоначально для анализа использовали отдельных метацеркарий из дочерних спороцист. RAPD-паттерны отдельных метацеркарий из одной спороцисты оказались одинаковыми для *Microphallus piriformes* и различными для *M. pygmaeus*. Таким образом, у последнего вида обнаружена гетерогенность ДНК среди особей, формирующихся в результате партеногенетического размножения одной спороцисты. Трактовка полученного результата требует дальнейшего детального исследования обнаруженной гетерогенности.

Многочисленные амплификации тотальной ДНК спороцист вместе с содержащейся в них совокупностью метацеркарий из одного заражения (одной локальной гемипопуляции) показали генетическую однородность использованного материала. Это позволило сравнивать генетические особенности различных группировок паразитов, используя спороцисту с метацеркариями в качестве характеристики каждой локальной гемипопуляции. Различия частот RAPD-локусов показаны для частей гемипопуляции *M. piriformes*, приуроченных к разным параксенным видам промежуточных хозяев — *L. saxatilis* и *L. obtusata*. Как для *M. piriformes*, так и для *M. pygmaeus* обнаружена генетическая дифференциация локальных гемипопуляций из моллюсков, собранных с участков побережья, отстоящих друг от друга на 10—20 км. Наблюдаемые различия, вероятнее всего, определяются особенностями распространения и путями миграции окончательных хозяев, а возможно, и их видовым составом.

Генетическая структура природных популяций паразитических организмов в целом и трематод в частности остается до сих пор слабо изученной. Причина этого, во-первых, в недостаточном использовании паразитологами биохимических и генетических подходов. Долгое время отсутствовали методы, которые позволяли бы определять индивидуальные генетические характеристики мелких по размеру организмов, что в случае трематод скорее правило, чем исключение. И только в начале 90-х годов, в связи с появлением PCR-ориентированных методик (Welsh, McClelland, 1990; Williams e. a., 1990), эта техническая проблема была решена.

Во-вторых, исследование генетической структуры популяций трематод сдерживается чрезвычайно высокой сложностью и многокомпонентностью формируемых ими паразитарных систем (Беклемишев, 1970; Добровольский и др., 1994). Исследование генетической структуры природной популяции этих организмов предполагает как рассмотрение различных поколений и фаз жизненного цикла, так и оценку степени генетической подразделенности локальных гемипопуляций, парагемипопуляций, в целом мета- и парапопуляционной структур (Granovitch, 1999). Наиболее перспективным нам представляется анализ природных популяций трематод, с точки зрения структуры их паразитарной системы. Этот подход и реализуется в предлагаемой

работе, где с применением метода RAPD (random amplified polymorphic DNA) была проанализирована степень генетической неоднородности природных гемипопуляций партенит и метацеркарий *Microphallus piriformes* и *M. pygmaeus*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Особенности жизненного цикла *Microphallus piriformes* и *M. pygmaeus*. Для обоих видов трематод характерен диксенный жизненный цикл без эмиссии церкарий, особенности которого подробно описаны в работах Галактионова (см., напр., Галактионов, 1993). Важная особенность жизненного цикла этих паразитов — развитие личинок гермафродитного поколения до стадии метацеркарии внутри дочерних спороцист, что приводит к формированию в первых промежуточных хозяевах длительно существующих локальных гемипопуляций метацеркарий, инвазионных для окончательного хозяина. Промежуточными хозяевами являются несколько видов литоральных моллюсков рода *Littorina*. Соответственно локальные гемипопуляции партенит и метацеркарий обоих видов трематод могут заражать несколько видов совместнообитающих литоральных моллюсков этого рода. Таким образом, гемипопуляция партенит с метацеркариями подразделена на части — парегемипопуляции (Гранович, 1996) в соответствии с популяциями разных видов промежуточных хозяев. В качестве окончательных хозяев *M. piriformes* и *M. pygmaeus* могут выступать несколько видов питающихся на литорали птиц: чайки, утиные, возможно кулики (Галактионов, 1993). Следовательно, и гемипопуляция марит также подразделена на параксенные части.

Сбор и первичная обработка материала. Сбор литоральных моллюсков *Littorina saxatilis*, *L. obtusata* и *L. littorea* проводили в 1998—1999 гг. в пределах губы Чупа Кандалакшского залива Белого моря (всего были собраны спороцисты из 398 зараженных моллюсков), а также в Баренцевом (Дальние Зеленцы) и Северном (Швеция, залив Скагеррак) морях (24 заражения). Основными местами сборов на Белом море послужили о. Плоская Луда, губа Яковлева и бухта Сельдяная. Эти точки расположены по оси губы Чупа от наиболее ее открытой, мористой части (о. Плоская Луда) до более закрытых, кутовых участков (бухта Сельдяная). Расстояние между крайними точками составляет около 20 км. Сбор моллюсков в каждом случае производили с достаточно большой площади и в пределах разных горизонтов литорали во время отлива.

Вскрытие моллюсков проводили в лабораторных условиях на МБС СПбГУ с использованием бинокулярного микроскопа МБС-9. При вскрытии определяли видовую принадлежность микрофаллид группы «*pygmaeus*» и стадию их зрелости, используя стандартную методику (Галактионов, 1993). Спороцисты микрофаллид отмывали от тканей хозяина раствором PBS, помещали в пробирки эппендорф и фиксировали 70-градусным этанолом. Материал хранили при +4°. Моллюски, зараженные одновременно несколькими видами паразитов, из дальнейших исследований были исключены.

Выделение ДНК и метод RAPD. Молекулярно-биологическая часть работы выполнена на базе отдела биологии клетки в культуре Института цитологии РАН. Для выделения тотальной ДНК из отдельных метацеркарий и спороцист использовали модифицированный метод Уолша (Walsh e. a., 1991). Достоинство данного метода состоит в том, что при ферментативной обработке тканей в присутствии хелирующей ионообменной смолы Chelex-100 в растворе остается чистый препарат тотальной ДНК, готовый для использования в ПЦР без дополнительной фенолхлороформной очистки. Белковый компонент раствора сорбируется на поверхности смолы и не препятствует последующей амплификации ДНК. Этот метод позволяет производить одноступенчатое микровыделение ДНК из объекта размером 300—500 мкм. Для выделения ДНК отдельную метацеркарию помещали в эппендорф, содержащий 10 мкл 5 %-го раствора Chelex-100 (Sigma Chemical Co.) и протеина-

зу К к концентрации 0.1 мг/мл. Пробу инкубировали 1 ч на водяной бане (Т +50°) с периодическим перемешиванием, после чего выделенную ДНК использовали для ПЦР. В случае спорозист объем лизирующей смеси составлял 100 мкл, а время лизиса — 1.5 ч. Количество ДНК из 1 метацеркарии вполне достаточно для последующего проведения нескольких ПЦР реакций с различными праймерами. Выделенную ДНК хранили при –20°.

Для анализа генетической гетерогенности паразитов применяли метод RAPD (random amplified polymorphic DNA) (Williams e. a., 1990; Welsh, McClelland, 1990). Амплификацию проводили в тонкостенных эппендорфах, содержащих 20 мкл смеси: 1х амплификационный буфер, 3 мМ MgCl₂, по 0.3 мМ dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 2U Taq полимеразы (СибЭнзим или Bion), 25 пмоль праймера и 2—10 нг ДНК. Амплификацию производили в циклере PTC-100TM (MJ Research Inc.) с использованием следующей программы: начальная денатурация 2 мин при 94°; далее следовали 30 циклов: 94° — 45 с, 35° — 30, 72° — 45 с; окончательная элонгация — 72° в течение 10 мин. Суммарно в работе было протестировано 15 коротких (10-нуклеотидных) праймеров. Основная часть из них — праймеры RAPD TM фирмы Operon Technologies (OPH-3, OPH-5, OPH-8, OPH-10, OPH-11, OPH-15, OPH-20, OPH-4, OPG-17), остальные фирмы Pharmacia Biothec (PR#1, PR#2, PR#3, PR#4, PR#5, PR#6). Кроме этого, использовались праймеры PR#4, OPH-20 и OPG-17, дополнительно синтезированные фирмами Cyber Gene (Швеция) и Литех (Россия).

Для анализа амплифицированных фрагментов использовали электрофорез в 5 %-ном полиакриламидном геле (ПААГ). После проведения электрофореза гели окрашивали в растворе бромистого этидия (0.1 мг/мл) в течение 5 мин, просматривали в ультрафиолетовом свете и фотографировали на микрат-300.

Статистическая обработка данных. Обсчет дорожек на гелях, т. е. генотипов конкретных особей паразита, производили следующим образом. Для каждого из праймеров выбирался хорошо амплифицируемый диапазон фрагментов (от 100 до 1300 п. н.), в нем для каждой особи определяли наличие или отсутствие фрагментов по всем четко различимым локусам. Запись производили в виде вектора «0» и «1», где «0» обозначает отсутствие фрагмента, а «1» его присутствие. В качестве метода первичного анализа и группировки данных был использован кластерный анализ (программа Statistica 4.5). Кластеризацию проводили методом Варда (Ward's method, Euclidean distances). Для оценки уровня значимости различий пар кластеров в случае достаточного количества вариантов использовали тест χ^2 .

Подавляющее большинство RAPD маркеров являются доминантными (Williams e. a., 1990; Welsh, McClelland, 1990). Определение генотипов и частот аллелей базируется на наблюдаемых частотах гомозигот по рецессивному аллелю (т. е. организм, у которых фрагменты в том или ином локусе отсутствуют). В случае доминантных маркеров для часто применяемых F-статистик может быть рассчитано только значение Fst. Поэтому как метод анализа достоверности различий между популяциями и субпопуляциями нами применялся другой метод — R × C тест Фишера, реализованный в компьютерной программе TERGA (Raymond, Rousset, 1995; Miller, 1997).

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Анализ генетической изменчивости спорозист и метацеркарий микрофаллид группы «*pygmaeus*» внутри локальных гемипопуляций

По результатам амплификации ДНК метацеркарий *M. pygmaeus* и *M. piriformes* из 15 использованных праймеров отобраны те, которые позволяли идентифицировать 5—15 отчетливых фрагментов в диапазоне молекулярных масс от 100 до 1300 п. н. При отборе праймеров также учитывалась их способность выявлять межвидовые различия у трематод. В результате для работы были использованы праймеры PR#3, PR#4, OPH-20, OPG-17.

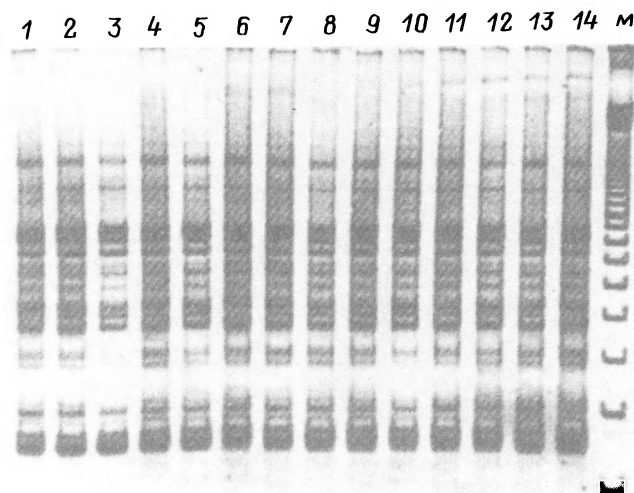


Рис. 1. RAPD паттерны метацеркарий *M. pygmaeus* из одной спороцисты (дорожки 1–14), полученные с использованием праймера #3.

M — маркер молекулярных весов (100 bp ladder).

Fig. 1. RAPD electrophoretic patterns of *M. pygmaeus* metacercariae within one daughter sporocyst (lanes 1–14) obtained using primer #3.

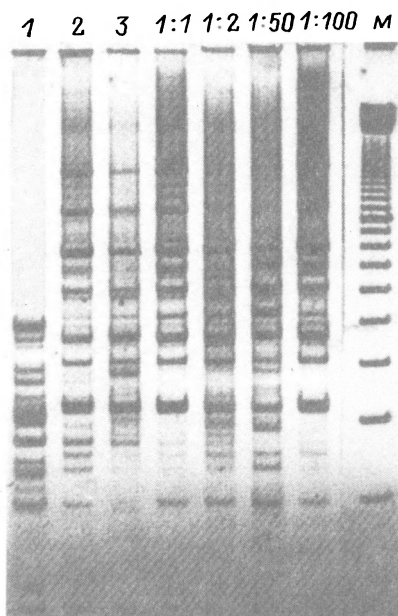


Рис. 2. RAPD паттерны метацеркарий *M. pygmaeus* из одной спороцисты, полученные с использованием праймера #4.

Дорожки: 1–3 — отдельные метацеркарии из одной спороцисты, 4–7 — разные разведения одного препарата тотальной ДНК.

Fig. 2. RAPD electrophoretic patterns of *M. pygmaeus* metacercariae within one daughter sporocyst obtained using primer #4.

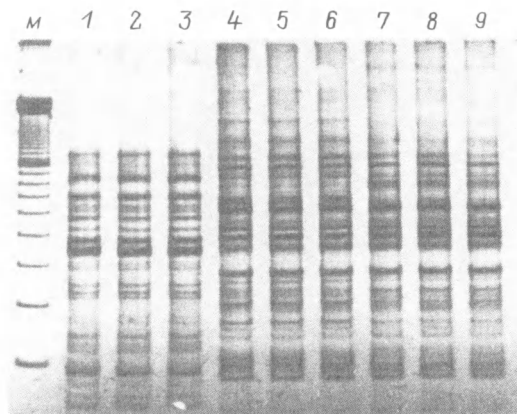
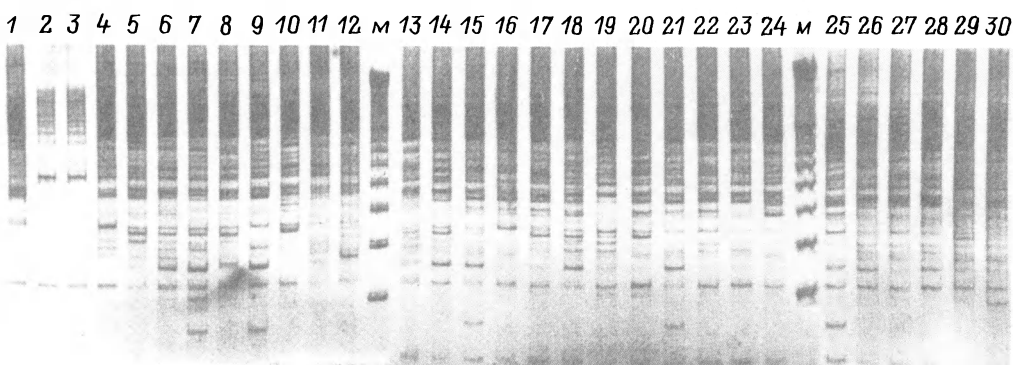


Рис. 3. RAPD паттерны отдельных дочерних спороцист с метацирками *M. pygmaeus* (из зараженных моллюсков *L. saxatilis*), полученные с использованием праймера OPH-20.

Дорожки: 1–3 — губа Яковлева, 4–6 — бухта Сельдяная, 7–9 — о. Плоская Луда.

Fig. 3. Rapd electrophoretic patterns of *M. pygmaeus* whole sporocysts, containing metacercariae (from infected *L. saxatilis* snails) obtained using primer OPH-20.

а



б

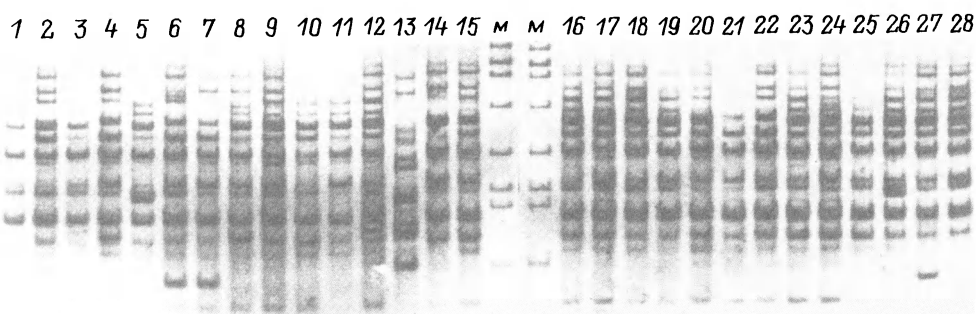


Рис. 4. Иллюстрация наличия полиморфных локусов в RAPD паттернах двух видов микрофаллид из разных географических мест обитания и разных промежуточных хозяев.

а — *M. piriformes* (праймер #4): губа Яковлева — из *L. saxatilis* — дорожки 1–5, из *L. obtusata* — 6–10, из *L. fabalis* — 11, 12 и 29; бухта Сельдяная — из *L. saxatilis* — дорожки 13–17, 30; о. Плоская Луда — из *L. saxatilis* — дорожки 18–21; корга у Левин-наволока — из *L. saxatilis* — дорожки 22–24, из *L. obtusata* — 25–28; б — *M. pygmaeus* (праймер OPG-17): о. Плоская Луда — из *L. saxatilis* — дорожки 1–3; корга у Левин-наволока — из *L. saxatilis* — дорожки 4–6; Швеция — из *L. saxatilis* — дорожки 12–15, из *L. littorea* — 7–11; бухта Сельдяная — из *L. saxatilis* — дорожки 16–19; губа Яковлева — из *L. saxatilis* — дорожки 20–28.

Fig. 4. The illustration of the polymorphic locuses, existing in the RAPD patterns of two microphallid species from different geographic habitats and different intermediate hosts.

На первом этапе работы оценивали генетическое разнообразие особей паразита внутри отдельных локальных гемипопуляций. Для этого была проверена генетическая гетерогенность отдельных метацеркарий из одной спороцисты. В большинстве случаев для обоих видов паразитов получено полное совпадение наборов амплифицированных фрагментов ДНК (рис. 1). Сравнение RAPD паттернов для спороцисты и содержащихся в ней метацеркарий также не выявило различий.

Однако при использовании праймера PR#4 для амплификации ДНК *M. pygmaeus* обнаружены различия по набору ПЦР-фрагментов даже у метацеркарий в пределах одной спороцисты (рис. 2, дорожки 1—3). Столь неожиданный результат требовал дополнительной проверки. Одним из факторов, влияющим на результаты амплификации, является концентрация ДНК в исходной реакционной смеси (Welsh, McClelland, 1990; Mikhailova, Johannesson, 1998). Для проверки возможности влияния концентрации ДНК трематод на характер получаемых данных проведена амплификация одной и той же тотальной ДНК, но при различных разведениях (рис. 2, дорожки 2—7). Видно, что даже при изменении концентрации ДНК в 100 раз наборы полученных амплификационных полос отличаются между собой незначительно.

Для дальнейшей работы тотальную ДНК получали из целых отдельных спороцист, содержащих метацеркарии. Соответственно для каждой локальной гемипопуляции трематод (заражения из одного моллюска) получены данные по нескольким спороцистам с метацеркариями. Разные спороцисты из одной локальной гемипопуляции не различаются по ПЦР-паттернам (рис. 3). Это характерно для обоих видов трематод. Аналогичный результат получен с использованием всех праймеров, в том числе и с упоминавшимся выше PR#4. Именно эта особенность положена в основу сравнения разных локальных гемипопуляций микрофаллид как в географическом, так и параксенном аспектах.

Используя в качестве источника ДНК спороцисты с находящимися в них метацеркариями, мы проанализировали *M. pygmaeus* и *M. piriformes* из 6 географически обособленных популяций губы Чупа. В анализе были использованы праймеры OPG-17, PR#4 (рис. 4) и OPH-20. Как отчетливо видно из электрофорезов, многие из локусов являются полиморфными. Наблюдались различия как между особями в пределах парагемипопуляций, так и различия по частотам аллелей между группировками. В трех исследованных точках (губа Яковлева, бухта Сельдяная и о. Плоская Луда), по предварительным данным, генетическая вариабельность паразитов была наибольшей, в связи с чем наше дальнейшее внимание было сконцентрировано на группировках паразитов из этих 3 точек. Из всех протестированных праймеров наиболее подходящим для анализа генетической структуры *M. piriformes* оказался праймер PR#4 (5'—AAGAGCCC GT—3'), а для *M. pygmaeus* — OPH-20 (5'—GGGAGACATC—3').

2. Различия генетического состава между парагемипопуляциями

2.1. *M. piriformes*. Связь параксенной составляющей среды обитания этого вида с его генетической изменчивостью проанализирована на примере двух промежуточных хозяев *L. saxatilis* и *L. obtusata* (табл. 1). Чтобы исключить влияние географического фактора производили попарные сравнения парагемипопуляций для каждой из трех точек сбора проб (губа Яковлева, бухта Сельдяная, о. Плоская Луда).

При проведении кластерного анализа всех паразитов из одной географической точки рассматривали как одну совокупность. Анализ полученных дендрограмм показал, что гемипопуляции *M. piriformes* в каждой точке сбора сформированы двумя более или менее четко различимыми генетическими группировками (рис. 5). Сравнение полученных группировок методом χ^2 подтверждает наличие генетической гетерогенности для гемипопуляции бухты Сельдяная ($p = 0.0001$); близкий к формальной статистической значимости результат получен также для гемипопуляции губы Яковлева ($p = 0.051$). В случае гемипопуляции *M. piriformes* с о. Плоская Луда применение

Таблица 1
Объем материала, использованного для статистической обработки
Table 1. The characteristic of samples

Хозяин	Место сбора		
	губа Яковлева	бухта Сельдяная	о. Плоская Луда
<i>Microphallus piriformes</i>			
<i>Littorina saxatilis</i>	23 37 % (n = 100)	20 28 % (n = 420)	15 8.6 % (n = 140)
<i>Littorina obtusata</i>	20 13 % (n = 283)	20 7.5 % (n = 320)	15 2.96 % (n = 506)
<i>Microphallus pygmaeus</i>			
<i>Littorina saxatilis</i>	10 18 % (n = 100)	8 1.91 % (n = 420)	15 34.3 % (n = 140)
<i>Littorina obtusata</i>	16 5.7 % (n = 283)	11 3.4 % (n = 320)	10 2.96 % (n = 506)
<i>Littorina littorea</i>	12 6.5 % (n = 185)		10 6.7 % (n = 145)

Примечание. Число в верхней строке — количество спорозист из отдельных моллюсков, взятых для амплификации, в нижней — экстенсивность инвазии (%) в каждой исследованной популяции одним из видов паразитов и число вскрытых моллюсков (n).

теста χ^2 невозможно из-за того, что ожидаемые частоты менее 5 для 2 из 3 кластеров. Для этого последнего случая можно отметить наличие одного кластера, сформированного трематодами только из *L. obtusata*.

Попарное сравнение парагемипопуляций *M. piriformes* из *L. saxatilis* и *L. obtusata* R × C тестом Фишера также показывает влияние вида промежуточного хозяина на генетическую структурированность гемипопуляций паразита для 2 из 3 исследованных точек (табл. 2).

2.2 *M. pygmaeus*. Для этого вида трематод исследованы три параксенные части гемипопуляций, связанные соответственно с *L. saxatilis*, *L. obtusata* и *L. littorea* (табл. 1). Данные свидетельствуют об отсутствии существенной генетической подразделенности в соответствии с используемыми промежуточными хозяевами (табл. 2). Единственная тенденция неравномерного распределения генотипов отмечена на о. Плоская Луда. Здесь обнаружены большие отличия генотипов трематод, паразитирующих в *L. littorea*: χ^2 — сравнение группировок *M. pygmaeus* из *L. littorea* и *M. pygmaeus* из *L. saxatilis*+*L. obtusata* показывает статистически значимые различия ($\chi^2 = 13.08$; $p = 0.0003$). В то же время попарное сравнение парагруппировок из разных видов хозяев различий не выявляет (табл. 2).

3. Микрогеографическая подразделенность локальных гемипопуляций

3.1 *M. piriformes*. Учитывая генетические различия парагемипопуляций *M. piriformes* из *L. saxatilis* и *L. obtusata*, при исследовании уровня микрогеографической структурированности группировки из каждого вида хозяина рассматривались отдельно. R × C тест выявляет различия генетической структуры *M. piriformes* в исследованных точках (табл. 3). Максимальные различия в частоте аллелей отмечены между

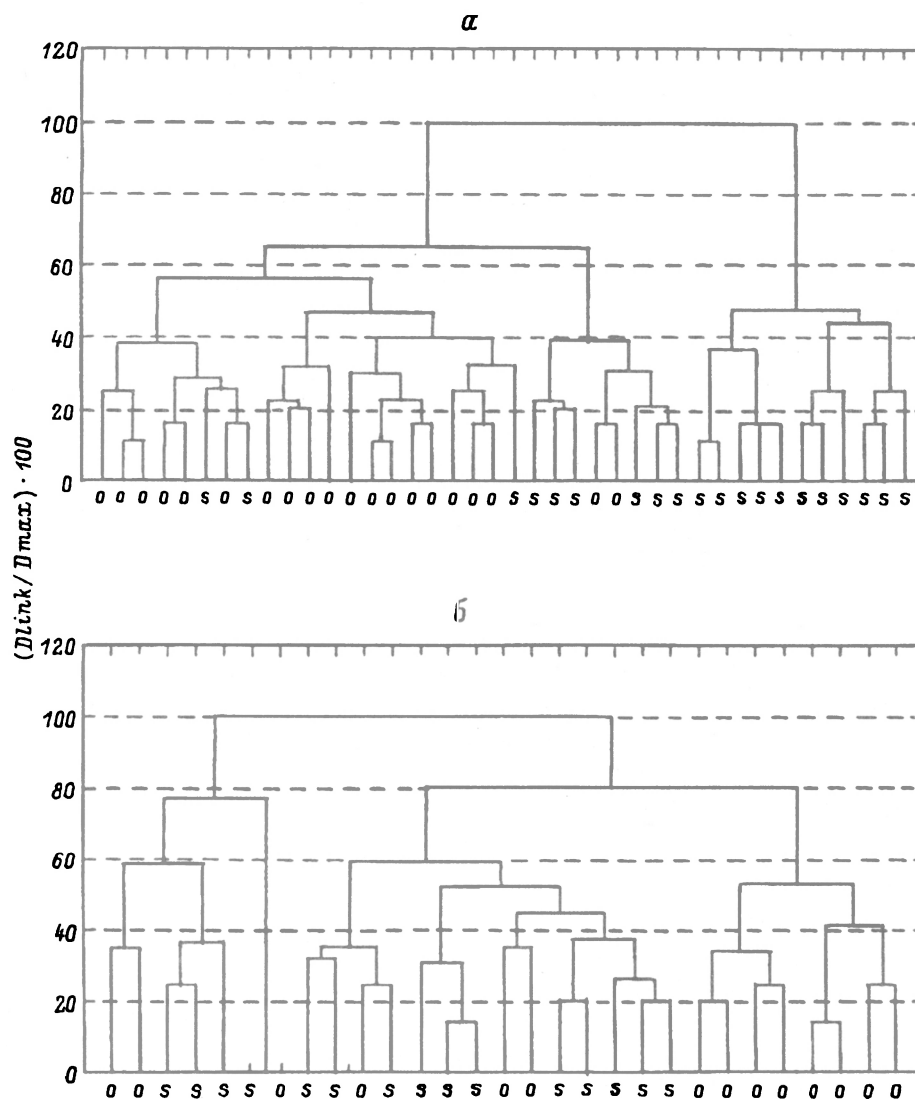


Рис. 5. Дендрограмма, полученная на основе кластерного анализа (с использованием Ward's method, Euclidean distances), для *M. piriformes*.

a — из *L. saxatilis* ($n = 20$) и *L. obtusata* ($n = 20$) бухта Сельдяная; *б* — из *L. saxatilis* ($n = 15$) и *L. obtusata* ($n = 14$) о. Плоская Луда; *S* — *L. saxatilis*; *O* — *L. obtusata*.

Fig. 5. Tree obtained by cluster analysis (Ward's method, Euclidean distances) for *M. piriformes*.

популяциями о. Плоская Луда и бухты Сельдяной (т. е. между наиболее удаленными точками). В меньшей степени, но также статистически значимо, обособлены группировки паразитов губы Яковлева и о. Плоская Луда. Что касается сравнения паразитов из губы Яковлева и бухты Сельдяной, то тест свидетельствует об их сходном генетическом составе.

Аналогичное исследование, проведенное для группировок *M. piriformes* из *L. obtusata*, также показало наличие генетической подразделенности (рис. 6). В отличие от предыдущего случая наиболее гомогенной и генетически обособленной оказалась группировка паразитов из бухты Сельдяной. Это подтверждается и данными $R \times C$

Таблица 2

Результаты R × C теста Фишера для субпопуляционных группировок
M. piriformes и *M. pygmaeus*, связанных с различными видами моллюсков

Table 2. The results of the R × C Fisher's test for the subpopulations *M. piriformes*
 and *M. pygmaeus*, infesting different paraxenic intermediate hosts (different species of snails)

Место сбора	Парагемипопуляции микрофаллид из <i>Littorina saxatilis</i> и <i>Littorina obtusata</i>	
	<i>Microphallus piriformes</i>	<i>Microphallus pygmaeus</i>
Губа Яковлева	$\chi^2 = 39.5$ df = 40 p = 0.495	$\chi^2 = 14.8$ df = 36 p = 1
Бухта Сельдяная	$\chi^2 = 81$ df = 40 p = 0.0001	$\chi^2 = 11.12$ df = 36 p = 1
О. Плоская Луда	$\chi^2 = 62.2$ df = 40 p = 0.0139	$\chi^2 = 19.05$ df = 36 p = 0.99
	<i>Microphallus pygmaeus</i> из <i>Littorina saxatilis</i> и <i>Littorina littorea</i>	<i>Microphallus pygmaeus</i> из <i>Littorina obtusata</i> и <i>Littorina littorea</i>
Губа Яковлева	$\chi^2 = 11.2$ df = 36 p = 1	$\chi^2 = 10.5$ df = 36 p = 1
О. Плоская Луда	$\chi^2 = 36.2$ df = 36 p = 0.46	$\chi^2 = 46.2$ df = 36 p = 0.12

Примечание. Для каждого места и сочетания парагемипопуляций приведены суммарные оценки по всем полиморфным локусам.

теста (табл. 3). Оставшиеся два кластера сформированы в основном трематодами губы Яковлева и о. Плоская Луда. Эти две последние группировки не различаются по данным R × C теста, т. е. представляют единую генетическую совокупность. Отметим, что *M. piriformes* в каждой из этих двух точек существенно отличаются от группировки паразита в *L. obtusata* губы Сельдяной.

3.2 *M. pygmaeus*. Как было отмечено в разделе 2.2, для этого вида трематод не выявлено существенной генетической подразделенности в соответствии с параксенными видами хозяев. В связи с этим исследование микрогеографической подразделенности проведено на всей совокупности данных вне зависимости от вида промежуточного хозяина. На полученной дендрограмме (рис. 7) четко выделяются три кластера, образованные преимущественно паразитами из губы Яковлева («1»), с о. Плоская Луда («2»), и из бухты Сельдяной («3»). Необходимо отметить все же, что кластеры характеризуются лишь количественным преобладанием паразитов из определенного места; в каждый из них попадают и данные по трематодам из двух других точек.

По результатам R × C теста (табл. 3) наиболее генетически обособлена группировка *M. pygmaeus* из бухты Сельдяной. Несколько в меньшей степени, хотя также статистически значимо различаются популяции *M. pygmaeus* губы Яковлева и о. Плоская Луда.

Таблица 3

Результаты R × C теста Фишера для субпопуляционных группировок
M. piriformes и *M. pygmaeus* из разных географических мест

Table 3. The results of the R × C Fisher's test for the subpopulations *M. piriformes*
and *M. pygmaeus* from different geographic localities

Место сбора	<i>Microphallus piriformes</i>		
	губа Яковлева	бухта Сельдяная	о. Плоская Луда
Губа Яковлева		$\chi^2 = 46.88$ df = 40 p = 0.211	$\chi^2 = 68.56$ df = 40 p = 0.0033
Бухта Сельдяная	$\chi^2 = 100.44$ df = 40 p < 0.0001		$\chi^2 = 101.83$ df = 40 p < 0.0001
О. Плоская Луда	$\chi^2 = 49.04$ df = 40 p = 0.154	$\chi^2 = 108.62$ df = 40 p < 0.0001	
	<i>Microphallus pygmaeus</i>		
	губа Яковлева	бухта Сельдяная	о. Плоская Луда
Губа Яковлева		$\chi^2 = 81.82$ df = 36 p < 0.0001	$\chi^2 = 58.7$ df = 36 p = 0.01
Бухта Сельдяная			$\chi^2 = 80.76$ df = 36 p < 0.0001
О. Плоская Луда			

Примечание. Над диагональю — значения χ^2 и уровни значимости для паразитов из *L. saxatilis*; под диагональю — из *L. obtusata*; для каждого места и сочетания парагемипопуляций приведены суммарные оценки по всем полиморфным локусам.

4. Обобщенный анализ частотного распределения аллелей в популяциях *M. piriformes* и *M. pygmaeus*

Комплексный анализ влияния параксении и микрогеографической подразделенности выполнен методом главных компонент. В качестве исходных данных использованы средние частоты аллелей по популяциям. В дополнение к уже обсуждавшимся данным по трем точкам района губы Чупа в анализ включены результаты исследования генетического состава группировок *M. piriformes* Баренцева моря и *M. pygmaeus* Баренцева и Северного морей.

Для *M. piriformes* 73.4 % общего варьирования объясняются совместным влиянием двух факторов (рис. 8, а). На первый фактор приходится 57.2 % варьирования, на второй — 16.2 %. Аналогичные данные по *M. pygmaeus* таковы: оба фактора объясняют 83.9 % общего варьирования (68.5 и 15.4 % на первый и второй факторы соответственно) (рис. 8, б).

Распределение переменных, отражающих генетическую структуру популяционных группировок *M. piriformes* в пространстве главных компонент, характеризуется достаточно компактной группой переменных с высокими нагрузками по первому фактору (рис. 8, а). Это группировки паразитов из обоих видов хозяев популяций губы Яковлева и о. Плоская Луда. Особняком располагаются переменные, характеризующие *M. piriformes* из бухты Сельдяной. При этом парагемипопуляции этого паразита из *L. saxatilis* и *L. obtusata* относительно сильно различаются между собой нагрузками

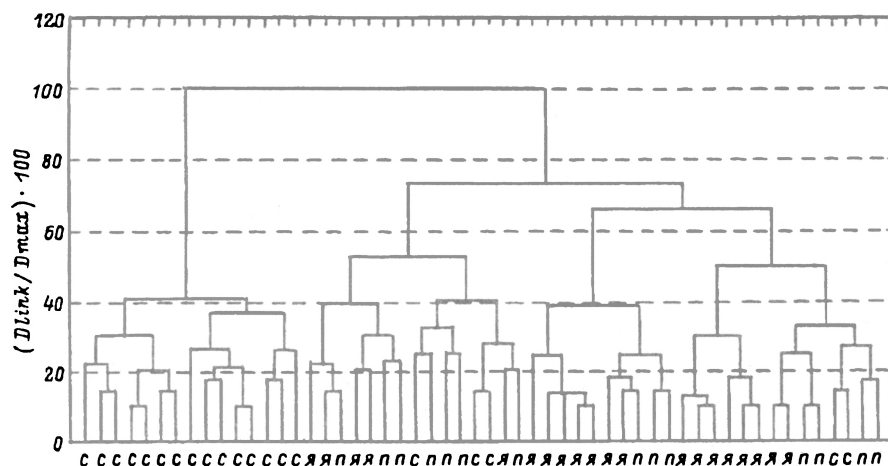


Рис. 6. Дендрограмма, полученная на основе кластерного анализа (и использованием Ward's method, Euclidean distances), для *M. piriformes* из *L. obtusata* из разных географических мест.

с — бухта Сельдяная, n = 20; л — о. Плоская Луда, n = 14; я — губа Яковлева, n = 20.

Fig. 6. Tree obtained by cluster analysis (Ward's method, Euclidean distances) for *M. piriformes* habited different geographic points.

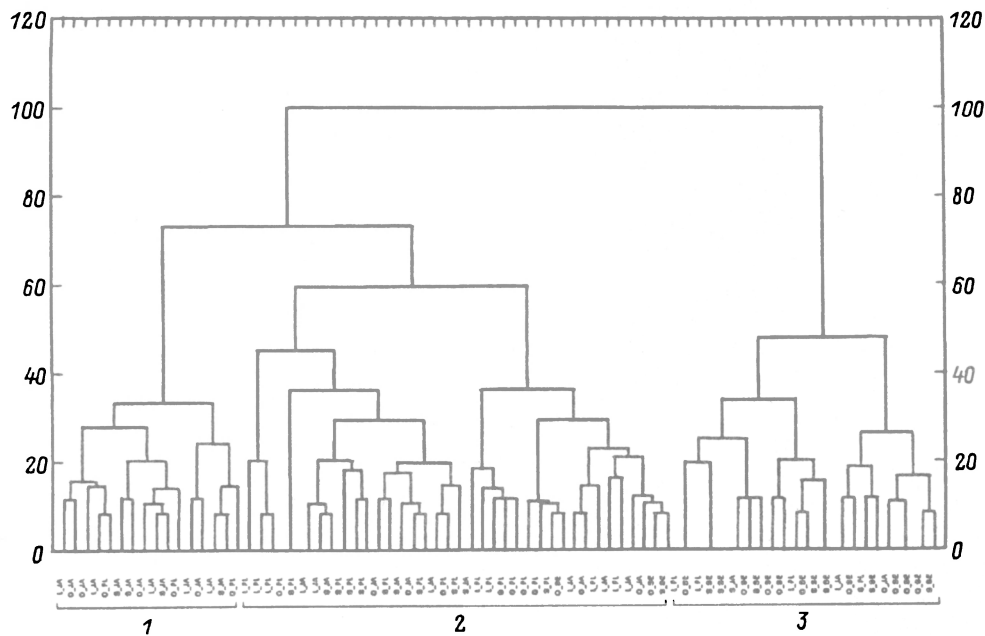


Рис. 7. Дендрограмма, полученная на основе кластерного анализа (с использованием Ward's method, Euclidean distances), для *M. pygmaeus* (n = 76) суммарно из всех видов промежуточных хозяев из разных географических мест.

S — *L. saxatilis*; O — *L. obtusata*; L — *L. littorea*; JA — губа Яковлева; PL — о. Плоская Луда; SE — бухта Сельдяная.

Fig. 7. Tree obtained by cluster analysis (Ward's method, Euclidean distances) for *M. pygmaeus* (n = 76) from all intermediate hosts and different geographic habitats.

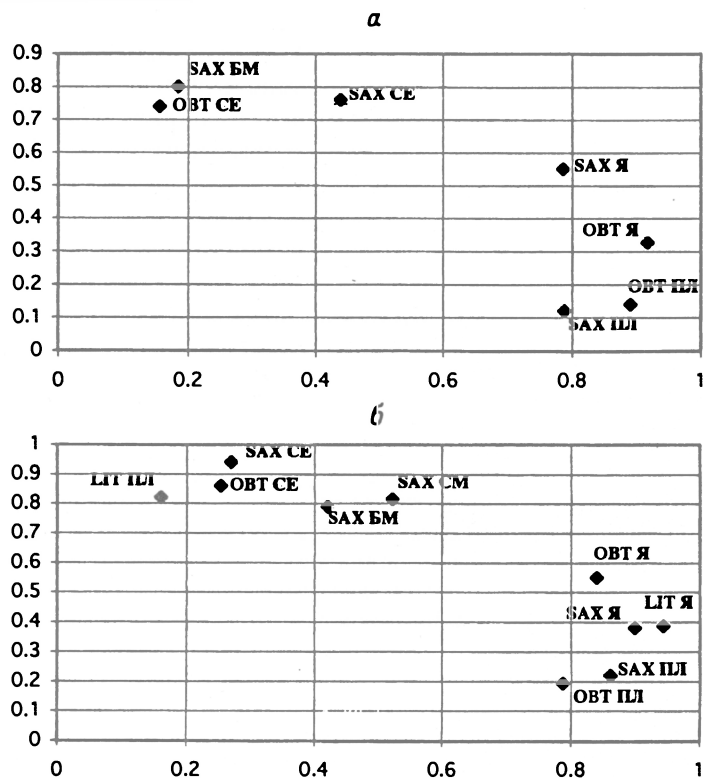


Рис. 8. Результаты компонентного анализа генетической подразделенности группировок особей *M. piriformes* (а) и *M. pygmaeus* (б) из различных видов хозяев и из разных точек сбора.

SAX — *L. saxatilis*; ОБТ — *L. obtusata*; ЛИТ — *L. littorea*; Я — губа Яковлева; ПЛ — о. Плоская Луда; СЕ — бухта Сельдяная; БМ — Баренцево море; СМ — Северное море.

Fig. 8. The results of component analysis of genetic differentiation of *M. piriformes* (a) and *M. pygmaeus* (b) groups from different intermediate hosts and different geographic points.

по первому фактору. Интересно отметить, что данные по баренцевоморским трематодам (из *L. saxatilis*) практически полностью совпадают по ординации с группировкой *M. piriformes* из *L. obtusata* бухты Сельдяной.

Сходные тенденции отмечены и для распределения переменных, характеризующих генетическую структуру *M. pygmaeus* (рис. 8, б). Еще более четко выделяются группировки, связанные с микрогеографической изменчивостью генетического состава. Плотная группа переменных с высокими значениями нагрузок по первому фактору включает трематод из разных хозяев, собранных в губе Яковлева и на о. Плоская Луда. Особняком от этой группы стоят переменные, характеризующие *M. pygmaeus* бухты Сельдяной, причем и в этом случае параксенные различия между группировками из двух видов хозяев практически не выражены.

Обращает на себя внимание различие положения переменных, характеризующих паразитов с о. Плоская Луда. Если трематоды из *L. saxatilis* и *L. obtusata* характеризуются сходными особенностями генетической структуры, то группировка этих паразитов из *L. littorea* существенно от них отличается. Соответствующая переменная обладает диаметрально противоположными (в сравнении с параксенными группировками) нагрузками по обоим факторам. Что касается данных по популяциям *M. pygmaeus* Баренцева и Северного морей, то их ординация оказывается сходной между собой; они имеют промежуточные значения нагрузок по первому фактору между группами беломорских популяций.

ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие метацеркарий внутри дочерних спороцист у всех видов микрофаллид группы «*pygmaeus*» происходит синхронно. Известно, что линия герминативных клеток, дающая начало метацеркариям, рано обособляется в онтогенезе, а формирование последних происходит в результате партеногенеза (Галактионов, Добровольский, 1998). Характер пролиферативной активности герминальных масс дочернего поколения микрофаллид дает основание сделать предположение, что сформированные метацеркарии представляют собой однородный генетический материал. Однако, видимо, из-за кажущейся очевидности этого факта какого-либо прямого генетического анализа пула метацеркарий внутри отдельной спороцисты до сих пор никто не проводил. В связи с этим обнаруженная нами генетическая гетерогенность метацеркарий видов *M. pygmaeus* (рис. 2) и *M. pseudopygmaeus* (данные не приведены) оказалась совершенно неожиданной. Для *M. piriformes* не было выявлено ни одного случая отличий метацеркарий друг от друга в пределах одной спороцисты. Последнее обстоятельство, а также опыты, показавшие отсутствие влияния концентрации ДНК на результаты ПЦР реакции (рис. 2), дают основание заключить, что выявленная неоднородность не является методическим артефактом. Следовательно, скорее всего, мы имеем дело с реально разным генетическим материалом у метацеркарий микрофаллид, однако пока только можно спекулировать о возможных причинах и механизмах геномных перестроек.

Для микрофаллид, как и для многих других видов трематод, характерно явление параксении — способность одного вида паразитировать в различных видах хозяев. Среда обитания разных парагемипопуляций партенит различна, что отражает межвидовые различия хозяев. Обнаруженная нами генетическая неоднородность *M. piriformes* из разных видов литторин может маркировать внутривидовую изменчивость трематод в соответствии с подразделенностью промежуточных хозяев. Дополнительной причиной обнаруженных параксенных различий может служить более широкий спектр окончательных хозяев, характерный для *M. piriformes* (Галактионов, 1993). По-видимому, еще рано говорить об обоснованных гипотезах, объясняющих генетическую разнокачественность парагемипопуляций. Очевидно, что для прояснения вопроса необходимо провести генетический анализ структуры как гемипопуляций дочерних спороцист, так и гермафродитного поколения. Отметим только, что наблюдаемая гетерогенность неабсолютна. Она проявляется не во всех обследованных точках и имеет характер частичной подразделенности.

Подтверждение наличия параксенной генетической подразделенности у трематод можно найти в литературе. Так, для *Fasciola hepatica* были показаны генетические различия марит, паразитирующих в кроликах и популяциях крупного рогатого скота (анализ проводился методом RAPD) (Семенова и др., 1995). При этом генетические различия между фасциолами из разных окончательных хозяев превосходили различия, полученные для группировок марит из удаленных друг от друга географических мест. Еще одну иллюстрацию можно найти в работах Флетчера и Вудрофа с соавторами, посвященных изучению генетического полиморфизма и гетерозиготности у лабораторных линий шистозом, поддерживаемых с использованием разных окончательных хозяев: линии *S. mansoni*, которые долгое время велись через мышей отличаются гораздо более низким уровнем полиморфизма и гетерозиготности, чем те, для ведения которых использовались обезьяны (Fletcher e. a., 1981; Woodruff e. a., 1987). Дальнейшие исследования показали, что снижение гетерозиготности происходит в результате отбора в окончательном хозяине, направленного против некоторых изоферментных аллелей (LoVerde e. a., 1985).

Микрогеографическая подразделенность группировок трематод также остается практически неизученной. Однако надо отметить работу Безра и Булата (1998), в которой авторы показали микрогеографические генетические различия церкарий *Trichobilharzia ocellata* в пределах водоемов г. Москвы. К сожалению, в работе приводятся только электрофореграммы и нет статистической обработки данных,

чтобы судить о статистической значимости полученных результатов. Гораздо шире представлены работы по сравнению генетического состава трематод из пространственно удаленных районов, хотя и здесь получаемые данные крайне противоречивы. Например, для видов рода *Schistosoma* обнаружен совершенно разный уровень генетического варьирования. Нето отмечает удивительно высокий уровень генетического сходства изолятов *S. mansoni* из удаленных географических точек (Neto e. a., 1993). Результаты RAPD анализа генотипов паразитов из 6 мест на территории Бразилии показали лишь 10 %-ный уровень различий между паразитами. Вудраф (Woodruff e. a., 1987) одновременно отмечает значительную генетическую дифференциацию для группировок *S. japonicum* в пределах Филиппин и полное отсутствие таковой для *S. nekongi* в пределах Лаоса. Дейвис и др., используя метод RAPD, обнаруживают значимую генетическую подразделенность *S. haematobium* на гораздо меньшей территории, между двумя рядом расположенными речными системами (Davies e. a., 1999). Наблюдаемую генетическую подразделенность очень трудно соотнести с действием каких-либо конкретных факторов. Так, при изучении *Fascioloides magna* на достаточно обширной территории была выявлена значимая генетическая подразделенность этого вида (Mulvey e. a., 1991). Однако авторам не удалось связать наблюдаемую подразделенность ни с генотипом окончательного хозяина, ни с географическим расстоянием между точками сбора. Одним из немногих исследований, продемонстрировавшим связь подразделенности популяции промежуточных хозяев и генетической подразделенности паразитов, была работа Ливли, выполненная на системе трематоды *Microphallus* spp.—моллюски *Potamopyrgus antipodarum* (Lively, 1989). Моллюсков собирали из трех близкорасположенных озер. Метацеркарий из зараженных моллюсков скармливали мышам и получали яйца от половозрелых марит для последующего перекрестного заражения моллюсков. Опыты показали, что успешнее всего заражаются моллюски паразитами, взятыми из «своего» озера. Таким образом, была показана связь генетической подразделенности промежуточных хозяев с генетической структурой популяций паразитов. Интересно отметить, что обнаруженный авторами высокий уровень миграции окончательных хозяев не нарушал эту генетическую подразделенность.

На основе полученного нами материала можно сделать предположение, что структурированность популяций микрофаллид зависит от популяционной структуры и мобильности в пространстве промежуточных и окончательных хозяев и географической структурированности ареала. В исследуемой системе литториниды обладают незначительной способностью к перемещениям, поэтому основной вклад в генетическую структурированность гемипопуляций *M. pygmaeus* и *M. piriformes* в масштабе устьевой части губы Чупа, вероятнее всего, вносят особенности распространения и миграции окончательных хозяев, а возможно, и их видовой состав. Метод главных компонент (рис. 8) наглядно демонстрирует обособленное положение группировок обоих видов паразитов из бухты Сельдяной. Логично предположить, что существуют и соответствующие частично подразделенные группировки окончательных хозяев, приуроченные к «более кустовой» и «более мористой» частям губы Чупа.

Мы не обнаружили существенной макрогеографической дифференциации популяций трематод. Однако небольшой объем использованного по Баренцеву и Северному морям материала не позволяет сделать окончательных выводов и требует проведения дополнительных исследований.

Работа поддержана молодежным грантом президиума Академии наук совместно с Российским фондом фундаментальных исследований и частично грантом Шведской академии наук.

Список литературы

- Беклемишев В. Н. Биоценологические основы сравнительной паразитологии. М.: Наука, 1970. 502 с.
- Бэер С. А., Булат С. А. Исследования полиморфизма геномной ДНК трематод в разных фазах развития // *Паразитология*. 1998. Т. 32, вып. 3. С. 213—219.
- Галактионов К. В. Жизненные циклы трематод как компоненты экосистем (опыт анализа на примере представителей семейства Microphallidae). Апатиты: КНЦ РАН, 1993. 190 с.
- Галактионов К. В., Добровольский А. А. Происхождение и эволюция жизненных циклов трематод. СПб.: Наука, 1998. 404 с.
- Гранович А. И. Паразитарные системы и структура популяций паразитических организмов // *Паразитология*. 1996. Т. 30, вып. 4. С. 343—356.
- Добровольский А. А., Евланов И. А., Шульман С. С. Паразитарные системы: анализ структуры и стратегии, определяющие их устойчивость // *Экологическая паразитология*. Петрозаводск, 1994. С. 5—45.
- Семенова С. К., Романова Е. А., Бенедиктов И. И., Рысков А. П. Анализ генетической изменчивости печеночного сосальщика *Fasciola hepatica* с помощью полимеразной цепной реакции со случайными праймерами // *Генетика*. 1995. Т. 31. С. 273—275.
- Davies C. M., Webster J. P., Kruger O., Munatsi A., Ndamba J., Woolhouse M. E. Host-parasite population genetics: a cross-sectional comparison of *Bulinus globosus* and *Schistosoma haematobium* // *Parasitology*. 1999. Vol. 119. P. 295—302.
- Fletcher M., LoVerde P. T., Woodruff D. S. Genetic variation in *Schistosoma mansoni*: enzyme polymorphisms in populations from Africa, South West Asia, South America and West Indies // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1981. Vol. 30. P. 406—421.
- Granovitch A. I. Parasitic systems and the structure of parasite populations // *Helgoland Mar. Res.* 1999. Vol. 53. P. 9—18.
- Lively C. M. Adaptation by a parasitic trematode to local populations of its snail // *Evolution*. 1989. Vol. 43. P. 1663—1671.
- LoVerde P. T., Dewald J., Minchella D. J., Bosshardt S., Damian R. T. Evidence for host-induced selection in *Schistosoma mansoni* // *J. Parasitol.* 1985. Vol. 71. P. 297—301.
- Mikhailova N. A., Johannesson K. A comparison of different protocols for RAPD analysis of *Littorina* // *Hydrobiologia*. 1998. Vol. 378. P. 33—42.
- Miller M. P. Tool for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data // *Computer software*, distributed by author. 1997.
- Mulvey M., Aho J. M., Lydeard C., Leberg P. L., Smith A. Comparative population genetic structure of a parasite (*Fascioloides magna*) and its definitive host // *Evolution*. 1991. Vol. 45. P. 1628—1640.
- Neto D. E., Souza C. P., Rollinson D. D., Katz S. D., Pena A. J. The random amplification of polymorphic DNA allows the identification of strains and species of *Schistosoma* // *Mol. Bioch. Parasitol.* 1993. Vol. 57. P. 83—88.
- Raymond M. L., Rousset F. An exact test for population differentiation // *Evolution*. 1995. Vol. 49. P. 1280—1283.
- Walsh P. S., Metzger D. A., Higuchi R. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material // *Bio Techniques*. 1991. Vol. 10. P. 506—513.
- Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // *Nucleic Acids Res.* 1990. Vol. 18. P. 7213—7218.
- Williams J. K. G., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // *Nucleic Acids Res.* 1990. Vol. 18. P. 6531—6535.
- Woodruff D. S., Merenlender A. M., Uphatam E. S. Genetic variation and differentiation of three *Schistosoma* species from the Philippines, Laos and peninsular Malasia // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1987. Vol. 36. P. 345—354.

СПбГУ, 199034; Институт цитологии РАН, 194064

Поступила 30.06.2000

GENETIC HETEROGENY IN THE NATURAL POPULATIONS
OF MICROPHALLUS PIRIFORMES AND M. PYGMAEUS PARTHENITES
(TREMATODA: MICROPHALLIDAE)

K. V. Khalturin, N. A. Mikhailova, A. I. Granovitch

Key words: Trematoda, Microphallidae, genetic population structure, RAPD markers.

SUMMARY

The random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was applied for the studies of genetic heterogeneity between several natural populations of trematodes belonging to the Microphallida family. Initially, the metacercariae from the daughter sporocysts infesting *Littorina saxatilis* and *Littorina littorea* periwinkles were used. Comparison of the banding patterns obtained for the different metacercariae within one sporocyst gave an unpredicted results. For two of three studied species (*M. pygmaeus* and *M. pseudopygmaeus*), the considerable differences in RAPD patterning was detected. According to the classical point of view, the process of cercariae (metacercariae in case of the «*pygmaeus*» group of microphallides) formation does not include DNA recombination. Because of that, all metacercariae within one single sporocyst should be genetically identical. However, data obtained clearly shows that at least in some cases it is not so. We can hardly believe that such result could be a methodological artifact, for not single difference in a RAPD patterns was recorded between the metacercariae within sporocysts of *M. piriformes*. Moreover, even the 100 fold dilution of the total DNA used for PCR amplification does not change the banding patterns. Hence, our results can not be explained by slight fluctuations in the DNA concentrations between the samples. The most evident conclusion is that we came across yet strange, but real phenomenon — some degree of genetic difference within the progeny of each of the sporocysts — metacercariae. However, the detailed study is needed to understand and interpret these observations correctly.

Amplification of the total DNA extracted from the whole sporocysts (containing metacercariae) never showed any differences in RAPD patterns between the parasites been derived from one infested snail (local parasite hemipopulation). That allowed us to compare different parasite populations referring the RAPD pattern of one sporocyst from a snail to as a representative of one local hemipopulation.

Analysis of the RAPD-loci frequencies showed a considerable genetic differences between the subpopulations of *M. piriformes*, infesting different paraxenic intermediate hosts — *L. saxatilis* and *L. obtusata*. This phenomenon was statistically significant for 2 localities of 3 studied. No heterogeneity within populations was recorded for *M. pygmaeus*.

Both *M. piriformes* and *M. pygmaeus* are characterized by the genetic differentiation in the microgeographic scale (within the Chupa bay of the White sea, the longest distance between the analyzed localities is 20 km). According to the frequencies of the RAPD-loci, parasites from the sheltered locality differ significantly from the parasites of other two localities exposed to the open sea. For both species the degree of genetic similarity between the populations correlates positively with the distance between the localities.

We can suppose that the population structure of microphallids depended mainly upon the population structures of their intermediate hosts, definitive hosts and geographical structure of the areal. However, taking into consideration the low motility of snails, we believe that the distribution, migration and species composition of the definitive hosts play the key role in the genetic structuring of *M. pygmaeus* and *M. piriformes* hemipopulations.

As an addition, the RAPD analysis of the parasite populations from the Barents Sea (East coast of Murman peninsula) and North Sea (Western coast of Sweden) revealed no significant genetic differences between the worms from those places and from the White Sea. However in case of this macrogeographic comparison, insufficient number of samples does not allow us to draw any final conclusions.